

**ÖSTROGENREZEPTOREN IM ZYTOSOL UND
IHRE TRANSLOKATION IN DEN ZELLKERN
BEI MAMMAKARZINOMZELLEN**

ANGELIKA STANGL

1986

*Diss
München*



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Frauenklinik der Universität München
im Klinikum Großhadern
Direktor: Prof. Dr. H. Hepp

Ostrogenrezeptoren im Zytosol und ihre
Translokation in den Zellkern
bei Mammakarzinomzellen

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
in der gesamten Medizin
an der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Angelika Stangl
aus
Eggenfelden
1986

Mit Genehmigung der medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. W. Eiermann

Mitberichterstatter: Prof. Dr. H. Hepp

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 20.05.1986

Meinen Eltern
in Dankbarkeit und Liebe

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1. Biochemische Grundlagen und Modell- vorstellung der Steroidhormonrezept- torwirkung.....	1
1.2. Eigenschaften der Steroidhormonre- zeptoren.....	3
1.3. Klinische Bedeutung der Steroid- hormonrezeptoren.....	3
1.4. Ziele dieser Arbeit.....	6
2. Beschreibung des Versuchsablaufes zur Bestimmung der Östrogenrezeptoren im Zytosol und im Zellkern.....	7
2.1. Aufbereitung der Gewebeprobe.....	7
2.2. Proteinbestimmung im Zytosol und Kernextrakt.....	9
2.3. DCC-Assay.....	10
2.3.1. Prinzip des DCC-Assay.....	10
2.3.2. Durchführung des DCC-Assay.....	11
2.3.2.1. Herstellung der Verdünnungen der Liganden.....	12
2.3.2.2. Abtrennen der freien Steroide.....	13
2.3.2.3. Herstellung der Dextran-Aktiv- kohlesuspension.....	14
2.3.2.4. Berechnung der Rezeptorkonzen- trationen aus der Zählrate.....	14
3. Auswertung der Meßdaten des DCC-Assay.....	15
3.1. Sättigungsanalyse.....	15
3.2. Scatchard-Plot.....	16
4. Auswertung der erhaltenen Meßwerte für spezifische Rezeptorkonzentrationen.....	19

4.1. Überblick der Ergebnisse.....	19
4.2. Beschreibung der verschiedenen erhaltenen Kurven.....	21
4.2.1. Östrogenrezeptoren im Zytosol positiv und im Zellkern negativ..	21
4.2.2. Östrogenrezeptoren im Zytosol negativ und im Zellkern positiv..	23
4.2.3. Östrogenrezeptoren im Zytosol und im Zellkern negativ.....	25
4.2.4. Östrogenrezeptoren im Zytosol und im Zellkern positiv.....	25
5. Diskussion.....	28
6. Zusammenfassung.....	32
7. Literaturverzeichnis.....	33
8. Lebenslauf.....	38
9. Danksagung.....	39

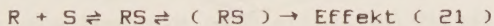
1. Einleitung

1.1 Biochemische Grundlagen und Modellvorstellung der Steroidhormonrezeptorwirkung

Mit der Rezeptortheorie als Modellvorstellung versuchte man, die selektive Wirkung verschiedener Substanzen auf bestimmte Zielgewebe zu erklären (Abb. 1):

Frei im Plasma zirkulierende oder an Plasmaproteine gebundene Steroidhormone entfalten keine biologische Wirkung. In der Zelle ist die Erkennung und Verarbeitung von Steuerungssignalen durch bestimmte Medikamente oder Hormone nur möglich, wenn spezifische Rezeptoren vorhanden sind. Ehrlich hat bereits 1913 diese fundamentalen Prinzipien beschrieben: " Drugs do not act unless they bind." (4)

1956 stellte Stephenson eine Formel auf, wonach das Steroidhormon mit dem zugehörigen Rezeptor einen primären Komplex bildet. Zur Auslösung der Wirkung wird dieser zu einem sekundären Komplex ' transformiert '.



Nach dem bisher geforderten Rezeptormodell wird das Steroidhormon auf noch nicht geklärte Weise durch die Zytoplasmamembran in die Zielzelle aufgenommen. Im Zytoplasma wird das Steroid vom Rezeptor mit hoher Affinität und Spezifität gebunden. Sodann erfolgt die ' Transformation '. Nach Bildung des sekundären Komplexes wird dieser in den Zellkern transloziert, bindet dort an das Chromatin und führt so zur Transskription spezifischer DNA-Segmente. Die dabei entste-

henden m-RNA-Moleküle werden an den Ribosomen des Zytoplasmas in die entsprechenden Proteine translatiert (3).

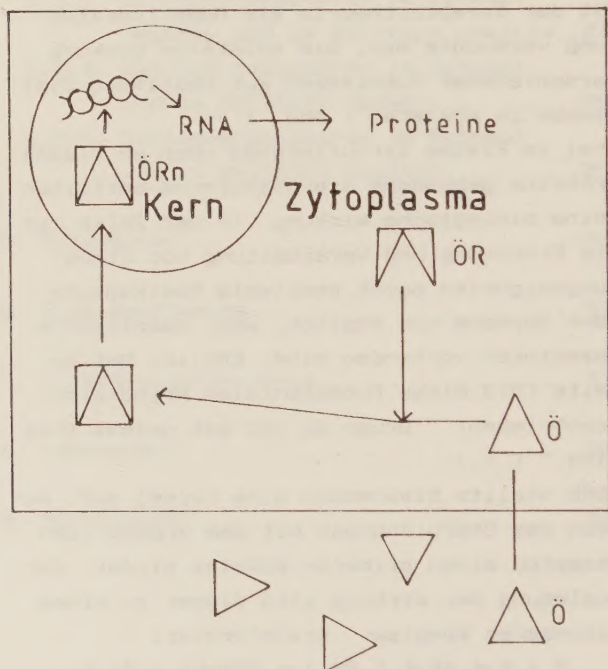


Abb. 1 STEROIDHORMONREZEPTORMODELL am Beispiel des Östrogenrezeptors

1.2. Eigenschaften der Steroidhormonrezeptoren

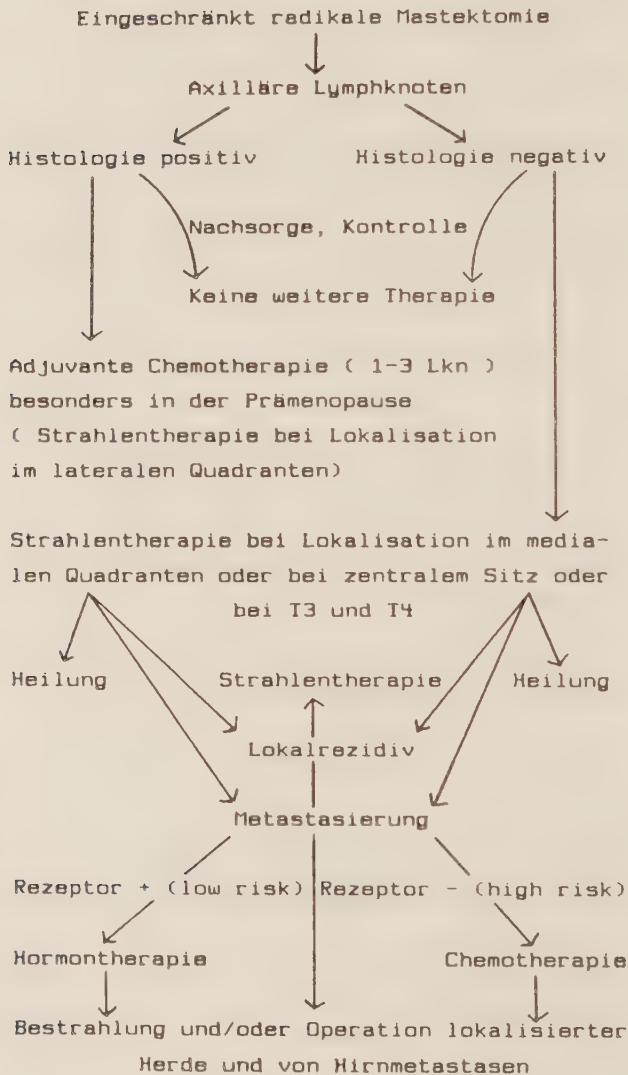
Die Steroidhormonrezeptoren sind ellipsoide Proteine mit einem Phosphor- und Kohlenhydratanteil (9). Ihre Stabilität ist gering: Bei Zimmertemperatur werden sie innerhalb weniger Stunden, bei Lagerung bei - 20 beziehungsweise - 70 Grad Celsius im Laufe einiger Wochen, inaktiviert. In flüssigem Stickstoff jedoch ist der Rezeptor über lange Zeit stabil (3).

1.3. Klinische Bedeutung der Steroidhormonrezeptoren

Die Bestimmung der Steroidhormonrezeptoren für Östrogen und Progesteron aus dem Tumorgewebe beim Mammakarzinom nimmt heute einen festen Platz zur Festlegung der Behandlungsstrategie des Karzinoms ein.

Nach wie vor liegt die primäre Versorgung des lokalisierten Karzinoms in den Händen des Chirurgen und des Strahlentherapeuten. Für die Therapie nach erfolgter Metastasierung wurden verschiedene Behandlungsrichtlinien erstellt. Das Vorgehen richtet sich nach dem Alter des Patienten (Prä- oder Postmenopause) und nach den Prognosekriterien (Dauer des rezidivfreien Intervalls, Metastasierungstyp, Karnofsky- Index), zu denen auch der Hormonrezeptorstatus im Tumor gezählt wird.

ALLGEMEINES THERAPIEPROGRAMM
(nach Sauer/Wilmans 1985)



Die Untersuchungen von Cooke und Mitarbeitern (2) ergaben, daß man mit dem Hormonrezeptorstatus Aussagen machen kann über das freie Intervall zwischen Auftreten des Primärtumors und klinisch feststellbaren Metastasen und Rezidiven.

So wird bei rezeptornegativem Befund im Primärtumor mit signifikant früherem Auftreten von Rezidiven gerechnet als bei rezeptorpositivem Befund. Zudem entspricht die Prognose der Patienten im Tumorstadium T 1-3, N 0, M 0, östrogenrezeptor negativ der der Patienten im Stadium T 1-3, N 1, M 0, östrogenrezeptor positiv.

Der Stellenwert der Rezeptoranalytik wird nach diesen Ergebnissen erhöht; er stellt zusammen mit dem Lymphknotenbefall das wichtigste therapeutische und prognostische Kriterium des Mammakarzinoms dar.

1.4. Ziele dieser Arbeit

In dieser Arbeit soll das bisherige Standardmodell für Steroidhormonrezeptoren vorgestellt und auf die Frage, ob der Hormonrezeptorkomplex aus dem Zytosol in den Zellkern transloziert wird, überprüft werden. Die Methoden der Östrogenrezeptoranalyse wird sowohl für das Zytosol als auch für den Zellkern beschrieben. In kurzen Umrissen soll ein Einblick gegeben werden in das verwendete Auswerteverfahren (Sättigungsanalyse, Scatchard-plot) der im DCC-Assay erhaltenen Meßdaten. Die Konzentrationen an Östrogenrezeptoren im Zytosol und im Zellkern werden verglichen und ihre Beziehung zueinander festgestellt.

Abschließend folgt die Diskussion dieser Arbeit mit dem Vergleich mit anderen Arbeiten. Die Arbeit analog mit den Progesteronrezeptoren wurde bei den gleichen Patientinnen parallel zu dieser von dem Doktoranden Peter Kurz durchgeführt.

2. Beschreibung des Versuchsablaufes zur Bestimmung der Östrogenrezeptoren im Zytosol und Zellkern

2.1. Aufbereitung der Gewebeproben

Unmittelbar nach Entfernung aus dem Organismus muß das zu untersuchende Mammarkarzinomgewebe in flüssigem Stickstoff oder in Trockeneis tiefgefroren werden, da die Rezeptorproteine schnell denaturiert und inaktiviert würden.

Mit dem Skalpell werden die Proben nach leichtem Auftauen in kleine Gewebestückchen geschnitten. Mit etwa 5 ml Homogenisationspuffer (s.u.) wird etwa 1 g Gewebe in einem Röhrchen homogenisiert, indem man mit dem Ultra-Turrax (Fa. Janke & Kunkel) einige kurze Stöße gibt. Zur Kühlung steht das Röhrchen in einem mit Eis gefüllten Becherglas. Die Pausen zwischen den Stößen sollen ein zu starkes Erwärmen des Homogenats verhindern.

Anschließend wird das homogenisierte Gewebe bei 120000 g für 30 Minuten bei 4 Grad Celsius mittels Festwinkelrotor (Fa. Kontron IFT 65.13) ultrazentrifugiert. Der Überstand stellt das Zytosol dar. Häufig liegt ein dünnes Fetthäutchen auf, welches mit einem Stäbchen leicht entfernt werden kann. Jetzt saugt man das Zytosol ab.

Zur Rezeptorbestimmung im Zellkern wird der Gewebebrei nach dem Homogenisieren für 15 Minuten bei 2500 Umdrehungen pro Minute unter Kühlung zentrifugiert.

Der Niederschlag, der der vorgereinigten

Kernfraktion entspricht, wird mit Homogenisationspuffer dreimal gewaschen:
Nach Zugabe von Puffer (etwa fünffaches Volumen des Sedimentes) wird der Niederschlag mit dem Ultra-Turrax aufgerührt und dann erneut wie oben zentrifugiert. Genauso bearbeitet man das zweite und das dritte Sediment. Dem vierten Sediment wird schließlich das fünffache Volumen Extraktionspuffer (s.u.) zugegeben. Alle 15 Minuten wird resuspendiert. Die Extraktion dauert 45 Minuten. Sodann wird die Suspension für 30 Minuten bei 65000 Umdrehungen pro Minute und 4 Grad Celsius ultrazentrifugiert. Der Überstand stellt den Kernextrakt dar.

Homogenisationspuffer:

10 mM Trispuffer

1.5 mM EDTA

5 mM Monothioglycerol

mit HCL auf pH 7.4 titrieren

Temperatur 4 Grad Celsius

Monothioglycerol dient als Stabilisator

Extraktionspuffer:

20 mM Trispuffer

0.6 M KCL

5 mM Monothioglycerol

10 % Glycerin

mit HCL auf pH 8.5 titrieren

Temperatur 4 Grad Celsius

Monothioglycerol dient als Stabilisator

Bei der Gewebeaufbereitung muß man bedenken, daß die Zellkompartimente zerstört werden, und die Rezeptoren deshalb in einem fremden

Milieu gemessen werden. So sind Aussagen über das Verhalten der Rezeptoren an ihrer ursprünglichen Stelle in der Zelle nur beschränkt möglich.

2.2 Proteinbestimmung im Zytosol und Kernextrakt

Bei der quantitativen Angabe des Rezeptorgehaltes bezieht man sich auf den Eiweißgehalt im Zytoplasma bzw. im Kernextrakt.

Die Eiweißbestimmung erfolgt nach der von Lowry angegebenen Methode (14).

Als Leerwert dient der Homogenisationspuffer. Die Eichkurve wird durch Standardlösungen von menschlichen Albumin-Globulin-Lösungen mit Konzentrationen von 1 mg/dl, 2 mg/dl und 4 mg/dl festgelegt.

0.02 ml der Probe wird mit 1 ml Testlösung (s.u.) und 0.1 ml von 1 N Folin Ciocalteu's phenol reagent für 30 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert. Bei 546 nm Wellenlänge werden sodann die Extinktionen gemessen.

Die Proteinwerte sollen für optimale Reaktionsbedingungen zwischen 1 und 5 mg/ml liegen. Im Falle zu hoher Werte kann man mit Homogenisationspuffer nachverdünnen.

Testlösung:

1 ml 1% Kupfersulfat

1 ml 2% K-Na-Tartrat

100 ml 2% Natriumkarbonat in 0.1 N NaOH

Die Testlösung wird für jede Messung frisch hergestellt.

2.3 DCC-Assay (dextran-coated-charcoal)

2.3.1 Prinzip des DCC-Assay

Cytosol und Kernextrakt werden zunächst mit ansteigenden Konzentrationen eines ^3H -markierten Steroids inkubiert. Dieses Steroid bindet selektiv an den gesuchten Rezeptor, welcher im Zytosol und Kernextrakt entweder frei oder als Komplex mit endogenem Steroid vorliegt. Bei einer Inkubationstemperatur von 0-4 Grad Celsius werden nur die freien Bindungsstellen abgesättigt. Um das endogen gebundene Steroid aus seiner Bindung zu verdrängen, wäre eine Inkubationstemperatur von 30-37 Grad Celsius nötig, welche jedoch zu einer rascheren Denaturierung der Rezeptorproteine führen würde. Aus diesem Grund werden nur die freien Bindungsstellen bestimmt. Das markierte Steroid bindet bei dieser Versuchsreihe sowohl an spezifische (Rezeptoren) als auch an unspezifische (z.B. Albumin, Steroidhormon bindendes Globulin) Bindungsstellen.

Parallel hierzu wird eine Titrationsreihe der selben Konzentrationen des markierten Steroids mit einem Überschuß eines unmarkierten Steroids inkubiert, welches die Rezeptoren mit hoher Spezifität blockiert. Hierbei wird also das ^3H -Steroid nur an unspezifische Stellen gebunden. Während der Inkubationszeit soll eine Gleichgewichtseinstellung mit den markierten und unmarkierten Steroiden erreicht werden, aber noch keine Denaturierung der Proteine stattfinden. Bei

Östrogenrezeptoren ist eine Inkubationszeit von 15 Stunden bei 4 Grad Celsius ausreichend. Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die nicht proteingebundenen Steroide durch Adsorption an Dextran-beschichtete Aktivkohle abgetrennt. Um eine Dissoziation des Steroid-Rezeptor-Komplexes zu verhindern sollte dieser Versuchsschritt rasch ablaufen.

Nach Zentrifugation der Dextran-Kohle-Lösung wird ein aliquot des Überstandes im Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen.

2.3.2 Durchführung des DCC-Assay

Vorbereitet werden für die

Doppelbestimmung der Gesamtbindung:

2 Konzentrationsreihen mit 3H-Östradiol

0,5 nM, 1 nM, 2 nM, 4 nM, 8 nM

und für die

unspezifische Bindung:

1 Konzentrationsreihe mit DES-Überschuß

(1600 nM).

3H-Östradiol bindet sowohl an den Rezeptor als auch an unspezifische Proteine. Der DES-Überschuß verdrängt 3H-Östradiol selektiv vom Rezeptor.

Je 0.1 ml der verschiedenen Ligandenkonzentrationen werden in je ein Glasröhrchen der 3 Konzentrationsreihen einpipettiert. Anschließend gibt man 0.2 ml DES in die Konzentrationsreihe für die unspezifische Bindung. Bei 4 Grad Celsius wird das Äthanol der Ligandenverdünnungen (s.u.) durch ein Hochvakuum verdampft, bis schließlich die Steroide an die Glaswand absorbiert sind. Im

nächsten Schritt gibt man dann 0.2 ml des Zytosols bzw des Kernextrakts dazu, wobei die Steroide durch kurzes Schütteln wieder in Lösung gehen.

2.3.2.1 Herstellung der Verdünnungen der Liganden

Mit dem Originalpräparat des markierten Östrogens (s.u.) wird eine 800 nM Stocklösung hergestellt. Diese ist auf 0.2 ml Zytosol bzw. Kernextrakt bezogen und wird in 0.1 ml EtOH-Lösung einpipettiert (10).

Umrechnung:

$800 \text{ nmol/l Zytosol} = 800 \text{ nmol} / 5000 \times 0.2 \text{ ml Zytosol} =$
 $= 0.16 \text{ nmol} / 0.2 \text{ ml Zytosol} =$
 $= 0.16 \text{ nmol} / 0.1 \text{ ml EtOH} =$
 $= 1.6 \text{ nmol/ml EtOH}$

Umrechnung für einen 1600 nM Überschuß von Diäthylstilböstrol (DES)

$1600 \text{ nmol/l Zytosol} =$
 $= 1600 \text{ nmol} / 5000 \times 0.2 \text{ ml Zytosol} =$
 $= 0.32 \text{ nmol} / 0.2 \text{ ml Zytosol} =$
 $= 0.32 \text{ nmol} / 0.1 \text{ ml EtOH} =$
 $= 3.2 \text{ nmol/ml EtOH}$

Diäthylstilböstrol (DES), MG 268.3

Präparat: Fa. Sigma D 4628

$1600 \text{ nM} = 3.2 \text{ nmol/ml EtOH} =$

$= 0.859 \text{ mikrogramm/ml EtOH}$

0.859 g werden auf 10 ml EtOH eingewogen und 10^5 -fach verdünnt.

³H-Östradiol

Präparat: Fa. NEN NET 317

spezifische Aktivität: 115 Ci/mmol

Konzentration: 1 mCi/ml

800 nM Stock: 1.6 mmol/ml EtOH

1 nmol = 115 mikroCi

1.6 nmol = 184 mikroCi

Verdünnung: $1000/184 = 5.4$

bezogen auf 1 ml Ausgangsmenge:

$(1 \text{ ml} \times 5.4) - 1 = 4.4 \text{ ml EtOH zugeben}$

Endkonzentrationen durch weiteres Verdünnen:

8 nM, 4 nM, 2 nM, 1 nM

2.3.2.2 Abtrennen der freien Steroide

Nach einer Inkubationszeit von 15 Stunden bei einer Temperatur von 4 Grad Celsius ist ein chemisches Gleichgewicht der Hormone mit den spezifischen und unspezifischen Bindungsstellen erreicht.

Um die noch freien Hormone abzutrennen, gibt man auf 0.2 ml Reaktionsgemisch 0.5 ml einer Dextran-Aktivkohlesuspension (s.u.), diese Suspension läßt man 10 Minuten bei 4 Grad Celsius einwirken und zentrifugiert sie anschließend bei 3000 U/min unter Kühlung. Mit einer Pipette werden je 0.45 ml abgehoben und mit 5 ml Szintillationscocktail (Fa. Beckmann 'ready solv IM HP') vermischt. Die dabei erhaltenen Meßwerte aus dem Flüssigszintillationszähler für die beiden Konzentrationsreihen ohne Zusatz unmarkierter Liganden (DES) entsprechen der Gesamtbindung (spezifisch und unspezifisch). Die Meßwerte der Reihe mit Zugabe eines Überschusses an unmarkierter Substanz ergeben

die unspezifische Bindung.

2.3.2.3 Herstellung der Dextran-Aktivkohle- suspension

Eine Kohlesuspension setzt sich zusammen aus 0.5% Aktivkohle und 0.05% Dextran in 10 mM Tris-HCL-Puffer bei pH 7.4.

Etwa 20% mehr der abgewogenen Aktivkohle wird zweimal mit aqua bidestillata gewaschen. Dabei rührt man 6 g Aktivkohle in 1 l aqua bidest. auf, läßt sedimentieren und saugt den Überstand mit einer Wasserstrahlpumpe ab. An der Glaswandung festhaftende Partikel werden entfernt. Der gleiche Vorgang wird wiederholt, und das zweite Sediment in der selben Art und Weise mit Tris-puffer gewaschen. Auf das dritte Sediment gibt man die Dextranlösung und füllt anschließend mit Puffer auf. Die Dextran-Aktivkohlesuspension wird noch mindestens 1 Stunde lang unter Kühlung gerührt.

2.3.2.4 Berechnung der Rezeptorkonzentrationen aus der Zählrate

Die Radioaktivität (in dpm) wird in einem Beta-Flüssigkeitsszintillationszähler (Fa. Beckmann LS 7500) gemessen. Jeder Meßwert in dpm entspricht einer Konzentration (nM) des markierten Östrogens.

Bei dieser Versuchsanordnung benötigt man folgenden Umrechnungsfaktor für 3H-Östradiol (10):

$$1 \text{ mmol/l} = 1 \text{ pmol/ml} = 0.2 \text{ pmol/0.2 ml}$$

$$1 \text{ pmol} = 115 \text{ nCi}$$

$0.2 \text{ pmol} = 23 \text{ nCi}$
 $23 \text{ nCi} = 5.1 \times 10^4 \text{ dpm}$
 folgt: $1 \text{ nM} = 5.1 \times 10^4 \text{ dpm}$
 $1.96 \times 10^{-5} \text{ nM} = 1 \text{ dpm}$
 Faktor Standard: $2 \times 10^{-5} \text{ (nM)}$
 Faktor Probe: $2 \times 10^{-5} \times 0.7/0.45 =$
 $= 3.1 \times 10^{-5} \text{ (nM)}$

3. Auswertung der Meßdaten des DCC-Assay

Die erhaltenen Meßdaten aus dem DCC-Assay werden mit Hilfe des Scatchard-plot und der Sättigungsanalyse ausgewertet. Als rezeptor-positiv gelten Werte größer als $10 \text{ fmol/mg Protein}$.

3.1 Sättigungsanalyse (Abb. 2)

Die Sättigungsanalyse ist ein nicht-lineares 'curve-fitting'-Verfahren (17) der Meßdaten im kartesischen Koordinatensystem. Auf der Abszisse werden die verschiedenen Konzentrationen des radioaktiv markierten Östrogens, auf der Ordinate die Meßwerte für die unspezifische und die Gesamtbindung in dpm, aufgetragen. Eine Gerade des Typs $y = ax$ wird durch die Meßdaten für die unspezifische Bindung, eine Kurve des Typs $y = y_0(1 - e^{-cx}) + ax$ durch die Meßpunkte für die Gesamtbindung gelegt. Dabei sollen jeweils die Quadrate der Abweichungen der Einzelpunkte von dieser Kurve ein Minimum werden.

Die graphische Subtraktion dieser beiden Kurven voneinander ergibt den Kurvenverlauf

des Typs $y = y_0(1 - e^{-cx})$ für die spezifische sättigbare Rezeptorbindung. Jetzt können für die einzelnen Konzentrationspunkte die zugehörigen dpm-Werte abgelesen werden. Die Konzentration (in nM) für die Rezeptorbindung erhält man nach Multiplikation mit dem Probenfaktor (s. 2.3.2.4). Zur Erklärung der mathematischen Herleitung der verschiedenen analytischen Ausdrücke für die unspezifische und spezifische Bindung sei auf die Originalarbeit von J.Jawny (10) verwiesen.

3.2 Scatchard-Plot (Abb. 3)

Für jeden Konzentrationspunkt errechnet man den Wert spezifische Rezeptorbindung dividiert durch freies, nicht am Rezeptor gebundenes, 3H-Steroid.

Diesen Wert trägt man in einem kartesischen Koordinatensystem als Ordinate gegen die Abszisse mit den Werten der spezifischen Bindung auf. Der Punkt, an dem die Gerade (Scatchard-Gerade) die Abszisse schneidet, ergibt den Wert des maximal spezifisch gebundenen 3H-Steroids und somit die Rezeptorquantität.

Prinzipiell könnte man direkt mit den Meßwerten des DCC-Assay den Scatchard-plot errechnen. Die Einzelpunkte im Koordinatensystem wären jedoch erheblich mehr gestreut und die Festlegung des Verlaufs der Scatchard-Geraden relativ unsicher. Daher wird zur Optimierung der Geraden dem Scatchard-plot die Sättigungsanalyse vorgeschaltet.

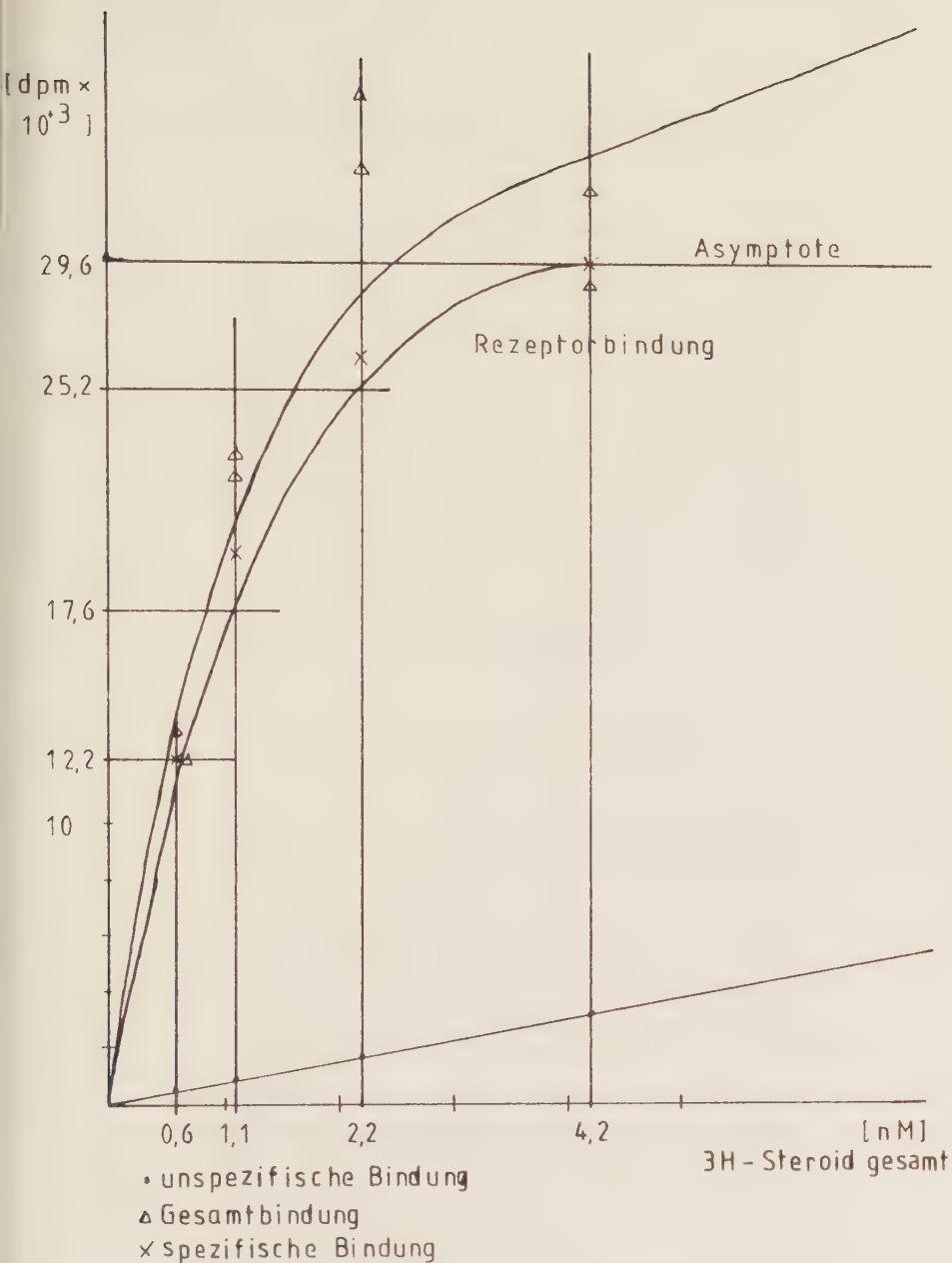


Abb. 2 SÄTTIGUNGSANALYSE bei linearem
SCATCHARD-PLOT

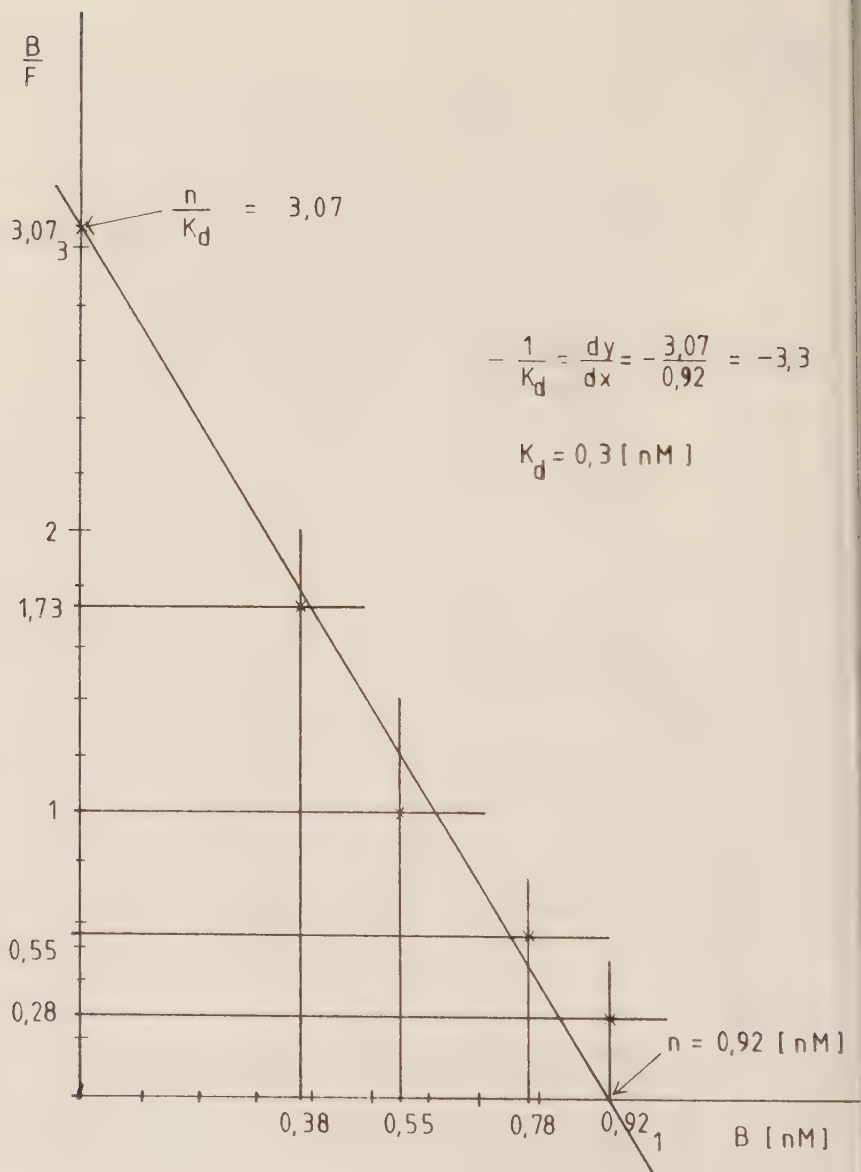


Abb. 3 Linearer SCATCHARD-PLOT

4. Auswertung der erhaltenen Meßwerte für spezifische Rezeptorkonzentrationen

4.1 Überblick der Ergebnisse

Untersucht wurde der Östrogenrezeptorgehalt im Zytosol sowie im Zellkern der malignen Zellen bei 100 Patientinnen mit Mammakarzinom. Davon befanden sich 19% der Patientinnen in der Prämenopause, 81% in der Postmenopause. Die Grenze zwischen Prä- und Postmenopause wurde bei einem Alter von 50 Jahren gezogen. Das Durchschnittsalter der Patientinnen betrug 50 Jahre. Als rezeptorpositiv gelten Werte größer oder gleich 10 fmol/mg Protein.

Aus der Tabelle 1 kann man ablesen, daß 21% der Patientinnen sowohl im Zytosol als auch im Zellkern rezeptorpositiv sind. Rezeptornegativ sind 45% der Frauen. Bei 22% der Mammakarzinompatienten lassen sich nur im Zytosol, bei 12% nur im Zellkern Östrogenrezeptoren nachweisen.

Unterscheidet man noch zwischen Patienten in der Prämenopause und in der Postmenopause (Tab. 2), so befinden sich von den 21 zyotosol- und kernpositiven Frauen 3 in der Prämenopause und 18 in der Postmenopause. Nur im Zytosol werden bei 8% prä- und bei 10% postmenopausalen Patientinnen Rezeptoren gefunden. Die Zahl derer, die nur kernrezeptorpositiv sind, beläuft sich auf 12, wobei alle das Alter von 50 Jahren überschritten haben. Keine Rezeptoren lassen sich bei 37% der Frauen in der Postmenopause und bei 8%

der Frauen in der Prämenopause nachweisen.
 Den Rezeptorgehalt in fmol/mg Protein kann
 man aus den Tabellen 3-6 ablesen (s. u.).
 Insgesamt korrelieren die erhaltenen Meßwer-
 te für Zytosolrezeptoren gut mit denen, die
 routinemäßig im onkologischen Labor der
 Frauenklinik im Klinikum Großhadern in Mün-
 chen bestimmt werden.

Tabelle 1 Östrogenrezeptoren

Zytosol	Kern	Prozent (n=100)
+	+	21
+	-	22
-	+	12
-	-	45

Tabelle 2 Östrogenrezeptoren

Zytosol	Kern	Prä	Post	Ges
+	+	3	18	21
+	-	8	14	22
-	+	-	12	12
-	-	8	37	45
Insgesamt		19	81	100

Prä = Prämenopause; Post = Postmenopause;
 Ges = Gesamt;

4.2 Beschreibung der verschiedenen erhaltenen Kurven

4.2.1 Östrogenrezeptoren im Zytosol positiv und im Zellkern negativ (Abb. 4)

Diese Konstellation ergibt 22 Meßpunkte. Auf der Abszisse wird der Punkt 0 aufgetragen für östrogenrezeptornegative Kerne, auf der Ordinate in fmol/mg Protein der Gehalt an Rezeptoren im Zytosol. Die Meßpunkte liegen alle unter 160 fmol/mg Protein. Eine Häufung der Punkte läßt sich im unteren Konzentrationsbereich bis etwa 55 fmol/mg Protein feststellen, und hier vor allem im Bereich 10-15 und 25-35 fmol/mg Protein. Eine besondere Verteilung der Meßpunkte für prä- oder postmenopausale Patientinnen liegt nicht vor.

Tabelle 3 Östrogenrezeptorgehalt im Zytosol in fmol/mg Protein

Prämenopause	Postmenopause	
27	44	39
28	45	27
23	158	35
12	46	31
54	35	20
32	10	11
18	67	
14	29	

Östrogenrezeptoren im

Zytosol positiv und im Kern negativ

n = 22

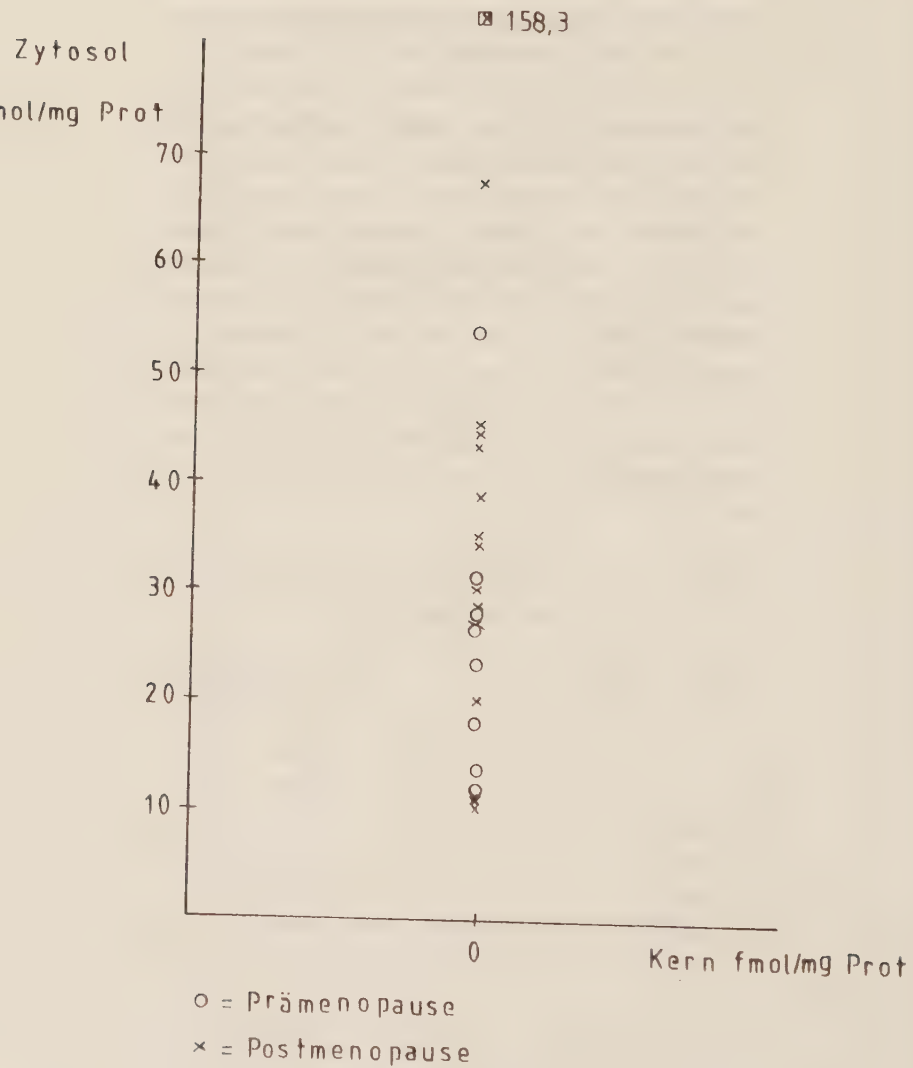


ABB 4

4.2.2 Östrogenrezeptoren im Zytosol negativ und im Zellkern positiv (Abb. 5)

Die Anzahl der Meßpunkte beträgt 12. Wählt man den 0-Punkt für Zytosolrezeptoren auf der Abszisse und den Gehalt an Kernrezeptoren in fmol/mg Protein auf der Ordinate, so liegen alle Meßwerte unter 243 fmol/mg Protein. Von den 12 Punkten liegen die Hälfte im Bereich von 10-20 fmol/mg Protein, der Rest unter 65 fmol/mg Protein. Ein Outlier liegt bei 242.5 fmol/mg Protein. Das Alter der Patientinnen beträgt durchweg über 50 Jahre.

Tabelle 4 Östrogenrezeptorgehalt im Zellkern
in fmol/mg Protein

Prämenopause	Postmenopause
-	64
-	47
-	65
-	243
-	14
-	24
-	34
-	16
-	16
-	18
-	14
-	12

Östrogenrezeptoren im

Zytosol negativ und im Kern positiv

n = 12

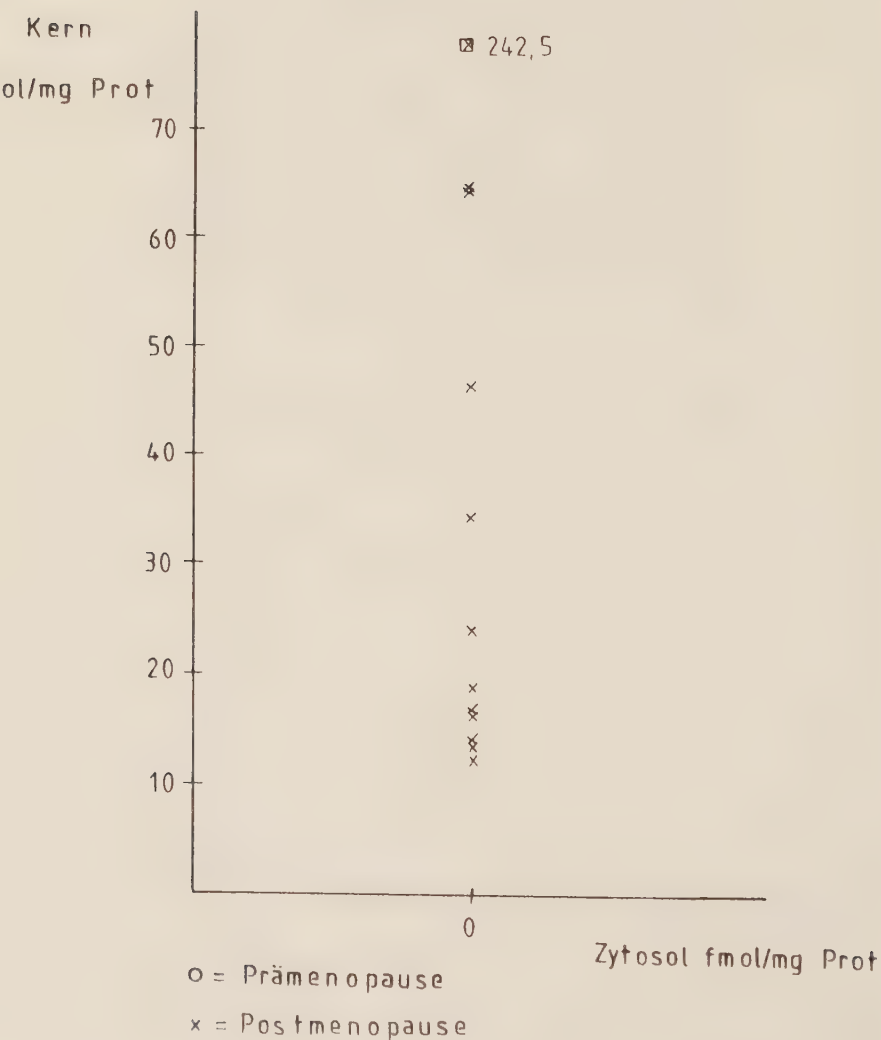


ABB 5

4.2.3 Östrogenrezeptoren im Zytosol und Zellkern negativ

Bei fast der Hälfte der untersuchten Patientinnen (n=45) waren weder im Zytosol noch im Zellkern spezifische Östrogenrezeptoren nachweisbar. Hiervon befand sich die weitaus größere Zahl der Patientinnen in der Postmenopause (ca 80%). Nur ein geringer Prozentsatz (ca 20%) von ihnen hat das Alter von 50 Jahren noch nicht erreicht.

4.2.4 Östrogenrezeptoren im Zytosol und im Zellkern positiv (Abb. 6)

Die Zahl n der Meßpunkte beträgt 21. Trägt man auf der Abszisse die Werte der Zytosolrezeptoren in fmol/mg Protein und auf der Ordinate die der Kernrezeptoren mit gleicher Einheit auf, so läßt sich eine Häufung der Meßwerte für Zytosol bis zu einem Rezeptorgehalt von 130 fmol/mg Protein und im Zellkern bis etwa 80 fmol/mg Protein feststellen. Punkte auf der Abszisse von größer als 380 fmol/mg Protein und auf der Ordinate von größer als 290 fmol/mg Protein werden nicht gefunden. Der größere Anteil der Patientinnen befindet sich in der Postmenopause (n prä=3, n post=18). Die drei Meßpunkte der prämenopausalen Frauen liegen bis 80 fmol/mg Protein.

Die Anordnung der Meßpunkte ist zufällig, das heißt, die Punkte stehen untereinander in keiner Beziehung.

Tabelle 5 Östogenrezeptorgehalt im Zytosol
und Zellkern in fmol/mg Protein

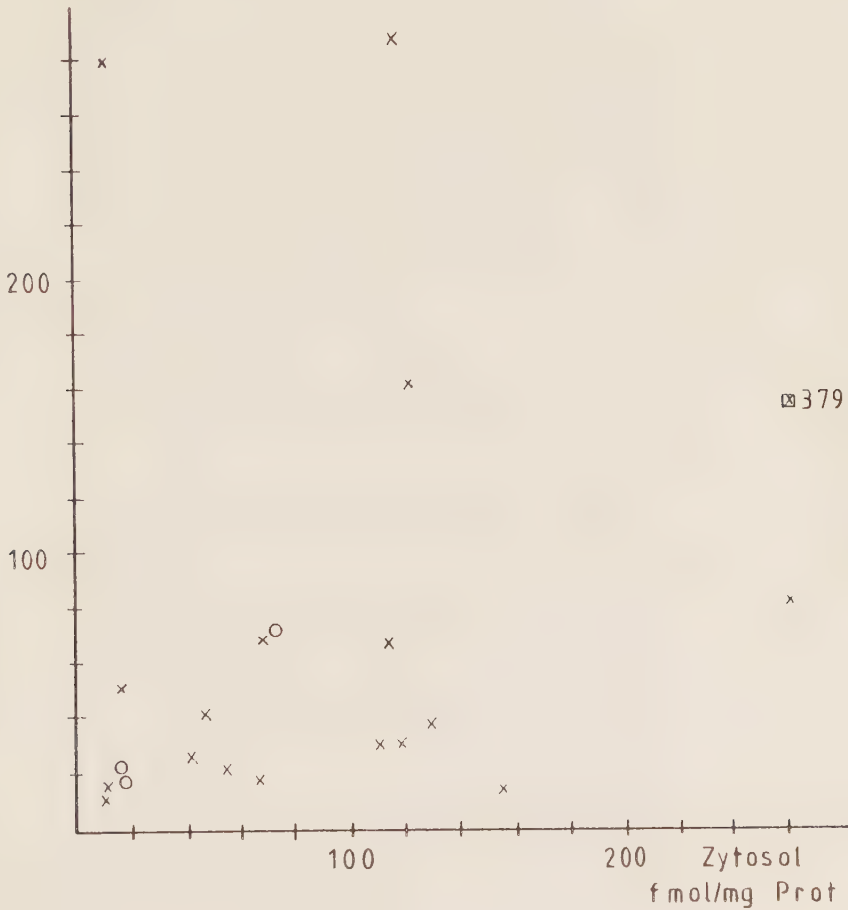
Prämenopause		Postmenopause	
Zyt.	Kern	Zyt.	Kern
73	74	119	31
17	23	121	161
15	16	110	32
-	-	68	69
-	-	11	278
-	-	117	289
-	-	40	26
-	-	129	38
-	-	379	156
-	-	46	42
-	-	154	19
-	-	113	67
-	-	260	81
-	-	66	19
-	-	15	52
-	-	10	11
-	-	14	17
-	-	53	22

Östrogenrezeptoren im

Zytosol und im Kern positiv

n = 21

Kern
fmol/mg Prot



o = Prämenopause

x = Postmenopause

ABB 6

5. Diskussion

Für die Therapie des metastasierenden Mammakarzinoms ist es heute Routine geworden, im Tumorgewebe Östrogenrezeptoren zu bestimmen. Der Erfolg einer Hormontherapie bei rezeptorpositiven Patientinnen ist unumstritten. Mit Hilfe eines Standardmodells für Steroidhormone versuchte man, sich den Wirkungsmechanismus der Hormone vorzustellen, wonach das freie Hormon im Zytosol an den spezifischen Rezeptor bindet, transformiert und in den Zellkern transloziert wird.

In jüngster Zeit weisen die Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen darauf hin, daß der angenommene Ablauf der Bindung der Steroide an den Rezeptor und die Translokation des Steroid-Rezeptorkomplexes im Standardmodell nicht der Wirklichkeit entspricht.

In dieser Arbeit wurde das Tumorgewebe von 100 Frauen mit Mammakarzinom auf Östrogenrezeptoren im Zytosol und Zellkern untersucht. Wie zu erwarten setzt sich die Zahl der Patientinnen zu etwa 80% aus Frauen in der Postmenopause zusammen - das Mammakarzinom gilt als Karzinom der älteren Frau.

Bei 57% der Probanden läßt sich kein Zytosolrezeptor nachweisen, wovon aber in 12 Fällen dennoch Kernrezeptoren gefunden werden konnten, eine Tatsache, die nicht leicht zu erklären ist. Stellt man sich jetzt das Standardmodell vor, so dürfte es diese Konstellation nicht geben. Man müßte auch im Zytosol Rezeptoren finden, um die Translokation des Steroid-Rezeptor-Komplexes nach-

vollziehen zu können. Interessant ist dieses Ergebnis auch im Hinblick auf die klinische Auswirkung: Es würde bedeuten, daß einer Gruppe von Mammakarzinompatientinnen eine relativ nebenwirkungsarme und doch wirkungsvolle Hormontherapie vorenthalten bleibt. Allerdings ist eine Zahl von 12 Probanden zu klein, um sichere Aussagen machen zu können. Berücksichtigt man die absolut etwa 4 mal größere Zahl der Patientinnen in der Postmenopause, so gibt es bezüglich des Hormonrezeptorstatus keine signifikanten Unterschiede bei Mammakarzinompatientinnen in der Prämenopause und in der Postmenopause. Betrachtet man nun die Kurven, bei denen der Gehalt an Östrogenrezeptoren im Zytosol gegen den im Zellkern aufgetragen wird (Abb. 4, 5, 6), so findet man ein bezüglich des herkömmlichen Standardmodells interessantes Ergebnis:

Die Meßpunkte für die Östrogenrezeptoren im Zytosol in Bezug auf den Zellkern liegen zufällig verteilt. Zwischen den einzelnen Punkten läßt sich keine Korrelation feststellen. Das heißt, es besteht keine Beziehung zwischen Zytosol- und Kernrezeptoren. Für das Standardmodell bedeutet diese Tatsache, daß eine Translokation des Steroid-Rezeptor-Komplexes aus dem Zytosol in den Zellkern nicht anzunehmen ist.

Zieht man jetzt noch andere Arbeiten diesbezüglich heran, so findet man ähnliche Ergebnisse:

Ein Beispiel stellt die Arbeit von J. Gorski und Mitarbeitern (7) dar.

In ihrer Versuchsreihe mit Östrogenrezeptor-

positiven GH3-Zellen aus Hypophysentumoren von Ratten wurde im Zytoplasma nur eine geringe Aktivität von gebundenem Östrogen gefunden, während der Großteil der Aktivität im Zellkern lokalisiert war. Gorski folgert, daß, wenn der unbesetzte Östrogenrezeptor im Zytosol lokalisiert wäre, die Rezeptorkonzentration im Zytoplasma einer enukleierten Zelle größer sein müßte als in der Gesamtzelle. Tatsächlich aber fand sich ein genau umgekehrtes Verhältnis. Aus den Ergebnissen seiner Arbeit stellt Gorski fest, daß der freie Rezeptor im Zellkern lokalisiert ist, und derjenige im Zytosol ein Extraktionsartefakt darstellt.

Neueste Untersuchungen mit monoklonalen Antikörpern im Enzymimmunoassay ergeben ähnliche Sachverhalte (8):

Geoffrey Greene führte immunzytochemische Versuche mit verschiedenen monoklonalen Antikörpern durch. Das zu untersuchende Mammakarzinomgewebe wurde tiefgefroren und in Ethanol oder Picrin-Säure-Formaldehyd fixiert. Die Ergebnisse seiner immunzytochemischen Untersuchungen zeigen deutlich, daß der Großteil des nativen Rezeptors in der intakten Zelle im Kern lokalisiert ist, vielleicht im Diffusionsgleichgewicht mit einer kleinen Zahl extranukleärer Rezeptoren, die die Steroide nach ihrem Transport durch die Zytoplasmamembran aufnehmen. Der Rezeptor erscheint erst nach dem Homogenisieren im Zytosol. Zudem konnte er mit seiner Technik gemischte Populationen von rezeptorpositiven und -negativen Zellen im menschlichen Mammakarzinom identifizieren.

Aus der angegebenen Literatur und den Ergebnissen dieser Arbeit scheint in der Zelle keine Transformation und Translokation eines Steroid-Rezeptor-Komplexes aus dem Zytosol in den Zellkern stattzufinden, wie es im gezeigten Standardmodell gefordert wird. Vielleicht bedingt eine lockere Bindung der Rezeptoren an Kernbestandteile in Abwesenheit von Steroidhormonen eine leichte Verschiebung des Rezeptors in das Zytosol. Außerdem stellt der Zytosolrezeptor wahrscheinlich ein Extraktionsartefakt dar.

6. Zusammenfassung

In dieser Arbeit werden Östrogenrezeptoren im Zellkern und im Zytosol von Tumorzellen des Mammakarzinoms und damit das Standardmodell für Steroidhormonrezeptoren überprüft. In der Einleitung wird das Rezeptormodell kurz erklärt und die Steroidrezeptoren in Aufbau und Eigenschaften beschrieben. Außerdem wird auf die klinische Bedeutung und praktische Anwendung der Rezeptoranalytik hingewiesen.

Im folgenden Kapitel wird der Versuchsaufbau dargestellt. Dazu gehören die Aufbereitung der Gewebeproben, die Proteinbestimmung im Zytosol und Kernextrakt sowie der DCC-Assay. Die jeweils benötigten Reaktionsgemische und Verdünnungen werden im entsprechenden Abschnitt angegeben.

Mit Hilfe der Sättigungsanalyse und des Scatchard-plots, die jeweils kurz charakterisiert werden, wertet man die Meßdaten aus den im DCC-Assay erhaltenen Zählraten aus. Die Ergebnisse werden anhand verschiedener Abbildungen und Tabellen erklärt.

Abschließend wird diese Arbeit mit der anderer Arbeitsgruppen verglichen und eine Schlußfolgerung gezogen.

7. Literaturverzeichnis

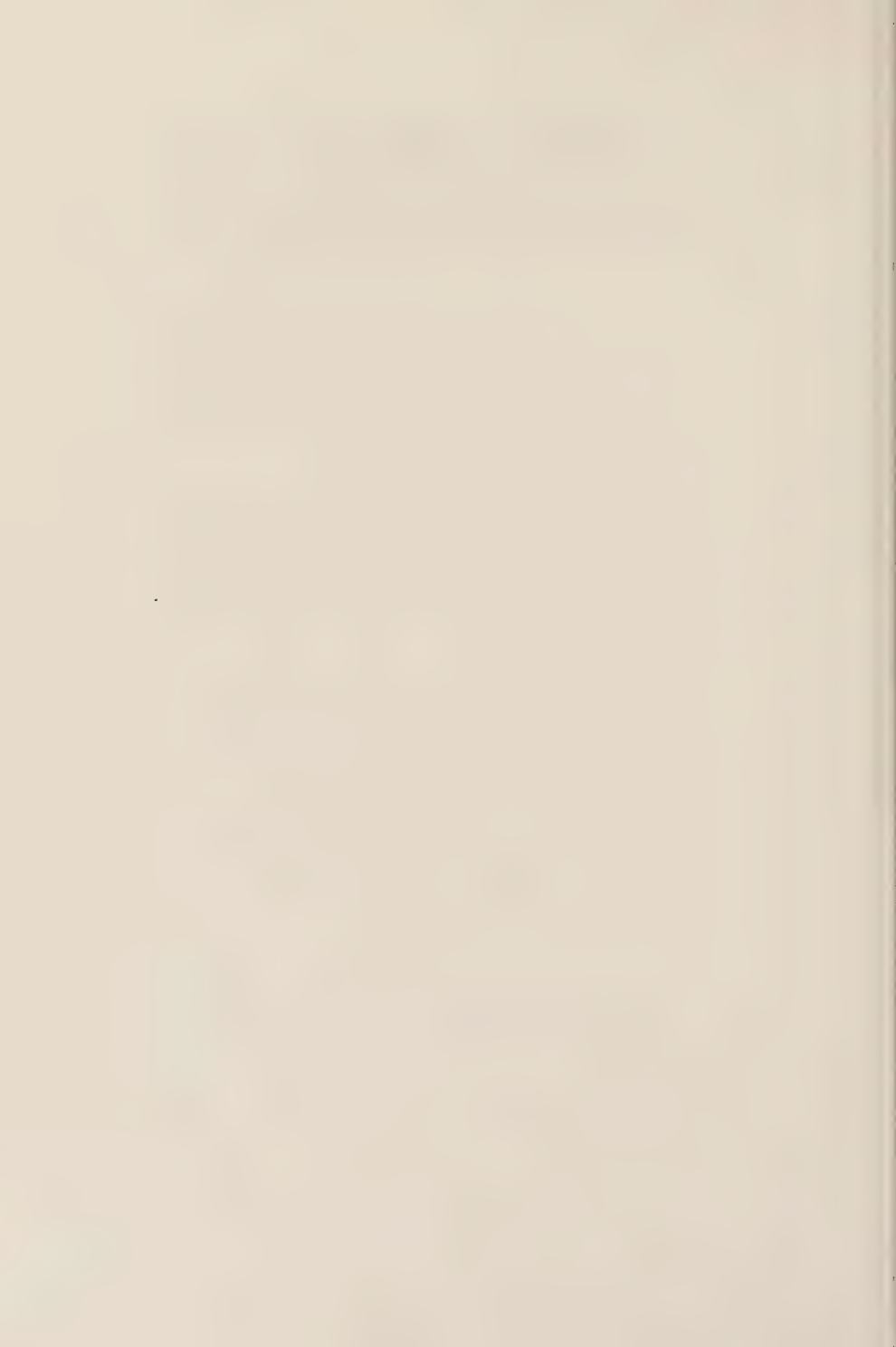
1. CLARK, J. H., PECK, E. J.
Female sex steroids. Receptors and function.
Springer Berlin, 4-36 (1979)
2. COOKE, T., GEORGE, W. D., GRIFFITHS, K.
Possible tests for selection of adjuvant systemic therapy in early cancer of the breast
Br. J. Surg. 67 (1980), 747-750
3. DAXENBICHLER, G., GRILL, H. J.
Steroid-Hormon- Rezeptoren: Grundlagen und Bestimmungsmethoden
Berichte der DGKV 3, 73-79 (1980)
4. EHRLICH, P.
Chemotherapeutics: Scientific principles, methods, and results
Lancet II, 445-451 (1913)
5. EIERMANN, W., EICHER, W.
Die endokrine Therapie des metastasierenden Mammakarzinoms unter Berücksichtigung der Steroidhormonbestimmung
Chir. Praxis 28, 21-26 (1981)
6. EIERMANN, W., JAWNY, J.
Steroidhormonrezeptoranalysen im Mammakarzinom
Bayerisches Ärzteblatt 7 (1982), 538-544

7. GORSKI, J., LIEBERMANN, M. E., WELSHONS, W. U.
Nuclear lokalisation of unoccupied estrogen receptors
Nature vol. 307, (Feb. 1984), 747-749
8. GREENE, G. L.
Immunochemical Studies of Estrogen Receptors
J. Steroid Biochem. Vol. 20. No 1.
pp. 51-56, 1984
9. HÄHNEL, R., TWADDLE, E., BRINDLE, L.
The influence of enzymes on the estrogen receptors of human uterus and breastcarcinoma
Steroids 24, 489-506 (1974)
10. JAWNY, J.
Steroidhormonrezeptoren. Biochemische und mathematische Methoden zum Nachweis intrazellulärer steroidbindender Proteine
Dissertation Universität München (1980)
11. JENSEN, E. U., JACOBSON, H. I.
Basis guides to the mechanism of estrogen action
Rec. Prog. Horm. Res. 18, 387-414 (1962)

12. JENSEN, E. U., BLOCK, G. E., SMITH, S.,
KYSER, K., DE SOMBRE, E. R.
Estrogen receptors and hormone depend-
ency
in: Estrogen target tissues and neopla-
sia, ed. by T. L. Dao
University of Chicago Press 23-57 (1972)
13. JENSEN, E. U., SMITH, S., DE SOMBRE, E. R.
Hormone dependency in breast cancer
J. Steroid Biochem. 7, 911-917 (1976)
14. LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR,
A. L., RANDALL, R. J.
Protein measurement with the Folin phen-
ol reagent
J. Biol. Chem. 193, 265-275 (1951)
15. MAASS, H., JONAT, W.
Steroidrezeptoren im Mammakarzinom. Be-
richt über ein Consensus-Meeting im Na-
tional Institute of Health, Bethesda,
USA
Geburts. Frauenheilk. 39, 761-764 (1979)
16. MUNCK, A.
General aspects of steroid hormone recep-
tor interactions
in: Receptors and mechanism of action of
steroid hormones, ed. by J.R. Pasqualini
Marcel Dekker New York 1-40 (1976)

17. RODBARD, D., FELDMANN, H. A.
Theory of protein-ligand interaction
in: Methods in enzymologie Vol. XXXVI
Part A, ed. by B. W. D'Malley and J. G.
Hardman. Academic Press New York 3-16
(1975)
18. SCATCHARD, G.
The attractions of proteins for small mo-
lecules and ions
Ann. N. Y. Acad. Sci. 51, 660-672 (1949)
19. SHYMALA, G.
Is the estrogenreceptor of mammary
glands a metallo-protein ?
Biochem. Biophys. Res. Commun. 64, 408-
415, (1975)
20. SOOST, H.-J., BAUR, S.
Gynäkologische Zytodiagnostik
Thieme Stuttgart 4. A., 86-87 (1980)
21. STEPHENSON, R. P.
A modification of receptor theory
Brit. J. Pharmacol. 11, 379-393,
(1956)
22. TOFT, D., GORSKI, J.
A receptor molecule for estrogens:
Isolation from the rat uterus and preli-
minary characterization
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 55, 1574-1581
(1966)

23. TUMORZENTRUM MÜNCHEN AN DEN MED. FAKUL-
TÄTEN DER LMU-TU
Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie
und Nachsorge. Mammakarzinome (1985)



8. Lebenslauf

Angelika Stangl, geboren am 2. November 1959 in Eggenfelden, als Tochter des Justizbeamten Johann Stangl und Frau Sophie, geb. Dirscherl.

Besuch der Mädchenschule in Eggenfelden von 1966 bis 1970.

Übertritt an das neusprachliche Karl-von-Closen Gymnasium in Eggenfelden.

Dort Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife im Juni 1979.

Beginn des Medizinstudiums an der Ludwig-Maximilians Universität in München im Wintersemester 1979/80.

Im August 1981 Ablegen der Ärztlichen Vorprüfung.

Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung im im August 1982.

Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung im August 1984.

Mündlicher Teil des Dritten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung am 29. Oktober 1985, schriftlicher Teil des Dritten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung am 30. Oktober 1985. Seit 13. November 1985 im Besitz der Approbation als Arzt.



Danksagung:

Mein besonderer Dank gilt

Herrn Prof. Dr. H. Hepp für die Bereitstellung
des Arbeitsplatzes in seiner Klinik

Herrn PD Dr. Eiermann für die Überlassung
des Themas der Arbeit

Frau M. Felber und Frau M. Waldherr für die
Unterstützung bei der Laborarbeit

February

Dear Mr. [Name] [Address]
[City] [State] [Zip]
[Country]
[Phone]
[Fax]
[E-mail]
[Web]
[Signature]
[Name]
[Title]
[Company]
[Address]
[City] [State] [Zip]
[Country]
[Phone]
[Fax]
[E-mail]
[Web]

